

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ANTIMICROBIANOS A CEPAS DE ENTEROBACTERIACEAE ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALFACE (*Lactuca sativa*) COMERCIALIZADA NA CIDADE DE SÃO LUÍS-MA

ADENILDE RIBEIRO NASCIMENTO*

JOÃO ELIAS MOUCHREK FILHO*

VICTOR ELIAS MOUCHREK FILHO*

ANDRÉ GUSTAVO LIMA ALMEIDA MARTINS**

SILVIO CARVALHO MARINHO***

CARMEN LÚCIA MARTINS SERRA****

LÚCIA MARIA COÊLHO ALVES*****

Objetivou-se verificar a sensibilidade de cepas de *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, isoladas de alface (*Lactuca sativa*), comercializada na cidade de São Luís-MA (Brasil), frente a vários antimicrobianos. As 41 amostras coletadas em cinco feiras de produtos hortifrutigranjeiros foram submetidas ao método rápido API-20E (bio-Mérieux) e ao teste de sensibilidade a antimicrobianos (método de Kirby-Bauer). Os antibióticos testados foram: cefalotina (CFL, 20 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg) e ácido pipemídico (PIP, 30 µg). Os resultados evidenciaram que, excetuando-se a cefotaxima, todas as cepas foram resistentes aos antibióticos testados. Constatou-se ainda que a *Klebsiella pneumoniae*, cepa mais resistente aos antimicrobianos, apresentou multirresistência a CFL, AMP, GEM, CLO, TET, CFO e PIP. Os achados permitem concluir que as alfaces comercializadas em feiras da cidade de São Luís devem ser consumidas com cautela, considerando a potencialidade de contaminação por cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos. Sugere-se assim, cuidadosa desinfecção dessas hortaliças como medida de segurança alimentar.

PALAVRAS-CHAVE: ALFACE; *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*; ANTIMICROBIANOS.

* Professores do Departamento de Tecnologia Química, Pavilhão Tecnológico, Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís (MA), Brasil (e-mails: adenild@bol.com.br; mouchrek@ufma.br; victo@ufma.br).

** Mestre em Ciências Marinhas Tropicais, Universidade Federal do Ceará.

*** Mestre em Química Analítica, UFMA.

**** Mestre em Saúde e Ambiente, UFMA.

***** Professora do Departamento de Patologia, Curso Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), São Luís (MA), Brasil (e-mail: luciamcalves@cca.uma.br).

1 INTRODUÇÃO

A cultura de produtos hortícolas, notadamente os consumidos na forma crua (como as alfaces), requer sérios cuidados no que se refere às condições de plantio. Os vegetais podem, facilmente, ser contaminados por práticas inadequadas de adubação e irrigação, tornando-se veículos de microrganismos potencialmente patogênicos para a saúde dos consumidores.

Além das contaminações por adubagem (animal ou vegetal) e água poluída, as alfaces são passíveis de serem contaminadas durante o transporte e armazenamento, ou ainda, no preparo de saladas, destacando-se as contaminações por bacilos entéricos pertencentes à família Enterobacteriaceae.

A microbiota de vegetais frescos constitui-se, basicamente, de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae, originárias da forma de cultivo do solo (convencional ou hidropônica), da água de irrigação, do ar, dos insetos e dos animais (MURRAY *et al.*, 1999).

Para SANT'ANA *et al.* (2002) a sanitização de vegetais, sob o ponto de vista da segurança alimentar, é considerada etapa crítica do processamento, assim como os aspectos de higiene pessoal na manipulação do produto.

A ingestão de hortaliças cruas contaminadas por enterobactérias tem sido reportada com frequência (SIQUEIRA *et al.*, 1997; NASCIMENTO e MARQUES, 1998; CABRINI *et al.*, 2002; PACHECO *et al.*, 2002). Tal fato é preocupante, pois esses contaminantes fecais podem causar gastroenterites. São considerados enteropatogênicos, que desempenham relevante papel nas infecções nosocomiais e outras infecções extra-intestinais (MURRAY *et al.*, 1999), além de exibirem múltipla resistência para vários tipos de antibióticos.

PALERMO NETO (2001) adverte que o uso de antimicrobianos, quer como medida terapêutica ou profilática, deve ser visto com ressalva. Doses de antimicrobianos administradas por tempo prolongado podem desequilibrar a microbiota normal do trato gastrointestinal com repercussão no metabolismo de substâncias endógenas e exógenas e na susceptibilidade a patógenos, como *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. Podem também, desenvolver pressão sobre a microbiota indígena do trato gastrointestinal favorecendo o aparecimento de cepas mutantes

resistentes aos antibióticos e a possibilidade de transmitir resistência a outras bactérias.

A presente pesquisa objetivou verificar a sensibilidade de bactérias da família Enterobacteriaceae, isoladas de alface, frente a vários antimicrobianos comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto a outubro de 2004, 41 amostras de alface (*Lactuca sativa*) foram coletadas em cinco feiras de comercialização de produtos hortifrutigranjeiros na cidade de São Luís, Maranhão. Transportadas para o Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão, as folhas foram separadas, lavadas com água potável e processadas em capela de fluxo laminar. Utilizou-se a técnica de cultivo em tubos múltiplos com Caldo Lauril Sulfato Triptose, Caldo EC e incubação a 35° e 45°C, respectivamente, durante 24 horas. As amostras foram plaqueadas em ágar eosina azul de metileno (EMB), com incubação a 35°C por 24 horas. As colônias foram transplantadas para tubos com ágar triptona de soja (TSA) e após incubação, a 35°C por 24 horas, realizou-se o isolamento e identificação de membros pertencentes à família Enterobacteriaceae pelo método rápido API-20 (BIOMÉRIEUX, 1997) e teste para avaliar sua sensibilidade frente à ação de antimicrobianos comerciais.

Depois de identificadas bioquimicamente como enterobactérias, as cepas foram testadas frente a antimicrobianos comerciais com concentrações definidas: cefalotina (CFL, 20 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg) e ácido pipemídico (PIP, 30 µg). Adotou-se o método de difusão de disco (MDD), também conhecido como Kirby-Bauer, descrito por BAUER *et al.* (1966). Após cultivo das cepas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com turvação comparável à escala McFarland, os inóculos foram espalhados na superfície de placas contendo Ágar Mueller-Hinton, colocando-se na sequência os discos impregnados com concentrações conhecidas dos antibióticos. Incubaram-se as placas em estufa a 37°C por 24 horas para posterior leitura dos halos de inibição, considerando-se as cepas testadas como sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes aos antimicrobianos testados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes bioquímicos permitiram a identificação das seguintes cepas: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*. Na Tabela 1 constam os resultados obtidos para o grau de susceptibilidade das cepas de enterobactérias isoladas frente aos antimicrobianos. Excetuando-se a cefotaxima (CTX), todas as cepas mostraram-se resistentes aos antimicrobianos testados. Constatou-se ainda que a cepa mais resistente foi *Klebsiella pneumoniae*, a qual apresentou multirresistência aos antibióticos CFL, AMP, GEM, CLO, TET, CFO e PIP. Provavelmente, o alto grau de resistência exibido por essa bactéria e demais cepas esteja relacionado com a produção de enzimas betalactamases, que inativam as drogas de espectro betalactâmicos (TAVARES, 1993; PITOUT, 1997), ou devido à resistência mediada por outras enzimas.

PALÚ *et al.* (2000) estudaram o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos da microbiota de frutas e hortaliças, servidas em restaurante do Rio de Janeiro. Constataram que de 11 cepas de *Escherichia coli* isoladas e testadas, 10 mostraram-se monorresistentes, enquanto que apenas uma apresentou resistência múltipla. No presente estudo não se constatou monorresistência e sim elevado grau (100%) de multirresistência à maioria dos antibióticos testados. Essa situação é preocupante, considerando que se trata de hortaliça largamente produzida e de grande consumo na cidade de São Luís em função do seu baixo custo. O fato das amostras estarem potencialmente contaminadas por bacilos entéricos multirresistentes a vários antibióticos, as colocam como potenciais causadoras de infecções gastrointestinais em indivíduos imunodeprimidos.

Na pesquisa realizada por LÁZARO *et al.* (1999) foi testado o nível de resistência de enterobactérias, isoladas das mãos de manipuladores de alimentos e das superfícies de produtos cárneos não-processados da Unidade de Alimentação da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Verificaram que mais de 50% das cepas isoladas mostraram-se resistentes à ampicilina, cefalotina, estreptomicina e tetraciclina, sendo a ampicilina (86,3% dos isolados) considerada o marco de resistência.

Os resultados obtidos evidenciaram que em casos de infecções graves, causadas pelas enterobactérias isoladas neste trabalho, dificilmente se obteria cura eficaz com o uso de 7 dos 8 antibióticos testados. Deve-se destacar que todas as cepas (100%) foram sensíveis à cefotaxima.

TABELA 1 - PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE, ISOLADAS DE ALFACES COMERCIALIZADAS EM FEIRAS DA CIDADE DE SÃO LUÍS, FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS COMERCIAIS

Cepas isoladas	N*	Antimicrobianos testados															
		CFL		AMP		GEN		CLO		TET		CFO		CTX		PIP	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Citrobacter freundii</i>	4	4	100	-	-	4	100	4	100	4	100	1	25	-	-	4	100
<i>Escherichia coli</i>	28	5	17,35	22	78,5	24	85,71	27	96,42	23	82,14	21	75	-	-	17	60,71
<i>Serratia marcescens</i>	3	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	2	66,66	-	-	3	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	3	100	-	-	3	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	3	100	3	100	3	100	3	66,66	3	100	3	100	-	-	-	-

N* = Total de 41 amostras.

CFL = Cefalotina; AMP = Ampicilina; GEN = Gentamicina; CLO = Cloranfenicol; TET = Tetraciclina; CFO = Cefoxitina; CTX = Cefotaxima;

PIP = Ácido Pipemídico.

4 CONCLUSÃO

Detectou-se alto grau de resistência das cepas de *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, isoladas de amostras de alface, frente à maioria dos antibióticos testados. A cefotaxima foi o fármaco que apresentou maior atividade antimicrobiana.

Devido à potencialidade de contaminação das alfaces por cepas de enterobactérias multirresistentes a antimicrobianos, essas hortaliças devem ser consumidas com cautela. Sugere-se assim, cuidadosa desinfecção como medida de segurança alimentar.

Abstract

ANTIMICROBIAL SENSITIVITY EVALUATION TO ENTEROBACTERIACEAE STRAINS ISOLATED FROM LETTUCE (*Lactuca sativa*) SAMPLES COMMERCIALIZED IN SÃO LUÍS -MA (BRAZIL)

The objective of this work was to verify the sensitivity of the strains *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*, isolated from lettuce (*Lactuca sativa*) commercialized in São Luís city, MA, Brazil, front to several antimicrobials. The 41 samples of lettuce, purchased in 5 fruit and vegetable market stands were submitted to the fast method API-20 (bio-Merieux), and to the antimicrobial sensitivity test (method of Kirby-Bauer). The tested antibiotics were: cefalotin (CFL, 20 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), chloramphenicol (CLO, 30 µg), tetracycline (TET, 30 µg), cefoxitin (CFO, 30 µg), cefotaxim (CTX, 30 µg) and pipemidic acid (PIP, 30 µg). The results evidenced that except cefotaxim, all tested strains were resistant to the tested antibiotics. It was verified that the strain of *Klebsiella pneumoniae*, more resistant strain to the antimicrobials, was multiresistant to CFL, AMP, GEM, CLO, TET, CFO and PIP. From the results it can be concluded that the consumption of lettuce merchandised in São Luís city-MA, Brazil markets should demand great care considering its contamination potential by enterobacter strains which are multiresistant to antimicrobials. It is suggested a careful disinfection of those vegetables as food safety measure.

KEY-WORDS: LETTUCE; *Citrobacter freundii*; *Escherichia coli*; *Serratia marcescens*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter aerogenes*; ANTIMICROBIALS.

REFERÊNCIAS

- 1 BAUER, W.; KIRBY, W.M.; SHEERRIS, J.C.; TURCCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.
- 2 BIOMÉRIEUX. **Salmonella, Escherichia coli and other**

Enterobacteriaceae in Foods: biochemical system identification (API-20). Hazelwood, 1997.

- 3 CABRINI, K.T.; SIVIERO, A.R.; HONÓRIO, E.F.; OLIVEIRA, L.F.C.; VENÂNCIO, P.C. Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em alfaces (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de Limeira, São Paulo, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.95. p.92-94, 2002.
- 4 LAZÁRO, N. S.; FARIAS, R.S.; RODRIGUES, D.P.; HOFER, E. Enterobacteriaceae oriundas de fontes humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.49-57, 1999.
- 5 MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington, D.C: American Society of Microbiology, 1999.
- 6 NASCIMENTO, A.R.; MARQUES, C.M.P. Avaliação microbiológica de saladas "in natura" oferecidas em restaurantes *self-service* de São Luís-MA. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.57, p.41-44, 1998.
- 7 PACHECO, M.A.S.R.; FONSECA, Y.S.K.; DIAS, H.G.G.; CÂNDIDO, V.L.P.; GOMES, A.H.S.; ARMELIN, I.M.; BERNARDES, R. Condições higiênic-sanitárias de verduras e legumes comercializados no CEAGESP de Sorocaba- SP. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.50-55, 2002.
- 8 PALERMO NETO, J. Resíduos de antimicrobiano em alimentos. **Revista CFMV**, n.22, p.65-71, 2001.
- 9 PALÚ, A.P.; PYRRO, A.S.; MIGUEL, M.A.L. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e marcadores de agressão da microbiota de frutas e hortaliças servidas em restaurantes do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17. 2000., Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: UFC, 2000. p. 4161-4161.
- 10 PITOUT, J.D. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. **American Journal of Medicine**, v.103, p.51-59, 1997.
- 11 SANT'ANA, A.; AZEVEDO, D.P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de vegetais. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.50-55, 2002.
- 12 SIQUEIRA, I.M.C.; MOURA, A.F.P.; GIRÃO, F.G.F.; SANTOS, W.L.M. Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da grande Belo Horizonte. **Revista Higiene Alimentar**, v.11, n.49, p.36-39, 1997.

- 13 TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos.**
São Paulo: Ateneu, 1993.